

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO</b>	<b>Código: POP LAPIA 1.1</b>
	<b>LAPIA (SERVIÇO DE CITOMETRIA)</b>	<b>Data da Emissão: 02/09/2019</b>
		<b>Versão: 01</b>
<b>CITOMETRIA DE FLUXO</b>		
<b>Responsável pela elaboração do POP:</b> Andréa Cony Cavalcanti Lidiane Alves Cunha	<b>Aprovado por:</b> Luiz Claudio Pereira Ribeiro	
<b>Responsável pela REVISÃO do POP:</b> Ignez Barbosa da Rocha Motta		
<b>1. DEFINIÇÃO</b>		
A imunofenotipagem consiste na identificação de populações de células pelos seus marcadores de superfície.		
<b>2. OBJETIVOS</b>		
Definir e estabelecer regras e procedimentos utilizando o equipamento FACSCalibur para a realização de testes de citometria de fluxo.		
<b>3. INDICAÇÃO</b>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pacientes do sistema Siscel que estejam em acompanhamento no LAPIA;</li> <li>• Pacientes do sistema Siscel oriundos de Postos cadastrados no HUGG;</li> <li>• Pacientes do ambulatório de alergia;</li> <li>• Clientes cadastrados em pesquisas.</li> </ul>		
<b>4. PESSOAS E PROFISSIONAIS QUE IRÃO REALIZAR O PROCEDIMENTO</b>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Funcionários do LAPIA.</li> </ul>		
<b>5. MATERIAL A SER UTILIZADO</b>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reagente Multi Test;</li> <li>• Tubos TruCOUNT;</li> <li>• BD FACS lysing;</li> <li>• TruCount Controls;</li> <li>• Calibrite PerPC Beads;</li> <li>• Hemoton/FACSFlow;</li> <li>• Luvas de procedimento;</li> <li>• Pipetas automáticas;</li> <li>• Estantes de trabalho;</li> <li>• Seringas de multidispensão.</li> </ul>		

## 6. DESCREVER DETALHADAMENTE AS ATIVIDADES A SEREM DESENVOLVIDAS

1. Ligar o estabilizador;
2. Ligar o aparelho;
3. Ligar o computador (FACStation). Se for ligado o computador antes do instrumento, no momento de correr as amostras aparecerá uma tela dizendo que há erro de conexão entre o computador e o equipamento;
4. Verificar se a válvula de pressão, localizada entre os reservatórios está desligada (sentido contrário da seta);
5. Encher ou esvaziar o reservatório de fluidos, de acordo com o necessário;
6. Verificar se o botão de fluxo está em HIGH e o botão de controle de fluido está em RUN (verde);
7. Verificar se há bolhas de ar na mangueira do filtro de salina. Caso tenha, desconectar a mangueira do filtro, bater levemente na mesma para que as bolhas subam e usando uma gaze pressionar a entrada da mangueira, até a retirada de todas as bolhas do sistema;
8. Conectar a mangueira do filtro de salina novamente;
9. Retirar as bolhas de ar das mangueiras do FACSflow e do reservatório de lixo, abrindo e fechando a válvula do filtro até que as bolhas não estejam visíveis nos tubos conectores;
10. FACScalibur está pronto para correr suas amostras.

## 7. ATENÇÃO A PONTOS IMPORTANTES E POSSÍVEIS RISCOS

- Calibração: São usados BD CaliBRITE BEADS e software BD FACSCComp, versão 2.0 para o ajuste das voltagens dos tubos fotomultiplicadores (PMT) e ajuste da compensação de fluorescência, checando a sensibilidade do instrumento sempre antes de usar.
- FACSCComp: É um software capaz de monitorar o desempenho do instrumento e calibração automática quando é usado com partículas BD CALIBRITE que são partículas padronizadas de dispersão e intensidade de luz conhecidas, o FACSCComp ajusta eletronicamente a compensação das fluorescências e checa a sensibilidade do citômetro; Identificar dois tubos 12 x 75mm, como A e B.
- Adicionar ao tubo A 1 mL de Facsflow ou PBS e ao tubo B 3mL.
- Ressuspender as partículas CaliBRITE, invertendo o frasco e homogeneizando as partículas.
- Pingar uma gota da partícula sem marcação (*unlabeled*) nos tubos A e B.
- Pingar somente no tubo B uma gota das seguintes partículas: FITC, PE e PerCP.
- Pingar uma gota de APC no tubo A.
- Controles: Remover três tubos BD Trucount da embalagem e identificar como: baixo, médio e alto.
- Pipetar 20 uL de reagente Multitest acima da grade de retenção. Não tocar a película liofilizada.
- Pipetar 50 uL do sangue total de paciente normal, bem homogeneizado, no fundo na parte lateral do tubo, acima da grade de retenção.
- Tampar os tubos e agitar gentilmente no vórtex para misturar.

- Incubar por 15 min no escuro à temperatura ambiente (+20°C a +25°C).
- Adicionar 450 uL da solução BD FACSLysing (1:10) a cada tubo.
- Tampar os tubos e agitar gentilmente no vórtex.
- Incubar por 15 min no escuro à temperatura ambiente (+20°C a +25°C).
- Agitar gentilmente cada tubo no vórtex por 30 segundos.
- Adicionar 50 uL de partículas controle no tubo identificado BAIXO, 50 uL de partículas controle no tubo identificado MÉDIO e 50 uL de partículas controle no tubo identificado ALTO.
- Agitar gentilmente cada tubo no vórtex por 30 segundos. As amostras estão prontas para serem analisadas no citômetro de fluxo.
- Preparo das amostras: Identificar as amostras dos pacientes com o nº de identificação do laboratório.
- Retirar os reagentes Multitest da geladeira e tubos Trucount.
- Fechar a embalagem de alumínio e retornar os reagentes sem uso para a caixa.
- Preparar de 15 em 15 amostras no máximo, para não ultrapassar o tempo recomendado de preparação da amostra.
- Pipetar 20 uL de reagente Multitest acima da grade de retenção. Não tocar na película liofilizada
- Pipetar 50 uL do sangue total, bem homogeneizado, no fundo, na lateral do tubo, acima da grade de retenção, por pipetagem reversa.
- Tampar os tubos e agitar gentilmente no vórtex para misturar.
- Incubar por 15 min no escuro à temperatura ambiente .
- Adicionar 450 uL da solução BD FACSLysing (1:10) a cada tubo.
- Tampar os tubos e agitar gentilmente no vórtex.
- Incubar por 15 min no escuro à temperatura ambiente (+20°C a +25°C)
- Proceder a leitura das amostras no citômetro de fluxo.
- Limpeza diária: Colocar um tubo contendo 3 mL de hipoclorito 1,0% na injeção de amostra (SIP) e deixar o braço do suporte aberto por 1 min.
- Fechar o braço do suporte e deixar correr o hipoclorito por 5min. O botão de velocidade da amostra deve estar em HI.
- Fazer o mesmo procedimento com a água destilada e/ou deionizada.
- Colocar o botão de fluído em STANDBY.
- Colocar um tubo contendo não mais que 1 mL de água. Este tubo deverá permanecer na injeção da amostra para prevenir formação de depósitos de sais no tubo de injeção da amostra.
- Exportação de resultados: Quando a leitura das amostras e controles é finalizada, o arquivo do dia é exportado utilizando um pendrive no computador do equipamento. Ir até BD files, Multiset files, data do dia e realizar a exportação para o programa Siscel.

**8. RESULTADOS ESPERADOS**

Resultado fidedigno.

**9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Manual BD – Quantificação de linfócitos TCD4 /TCD8